

1B 04/03536

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

REC'D 14 FEB 2005	
WIPO	PCT

Aktenzeichen: 103 50 122.3

Anmeldetag: 28. Oktober 2003

Anmelder/Inhaber: Alexander Cherkasky, 40477 Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Fusionsproteine enthaltend spezifische Antigenbinde,
- Mikrotubulibinde und Immunantwort – auslösende
Regionen

IPC: C 07 K 19/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 18. November 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Stanschus



Fusionsproteine enthaltend spezifische Antigenbinde, - Mikrotubulibinde und Immunantwort - auslösende Regionen

Die Erfindung betrifft die Bereiche der Tumorphysiologie und der Biotechnologie.

In der Tumorthherapie stellen Operationen, Bestrahlung und Chemotherapie nach wie vor die entscheidenden Maßnahmen zur Therapie der Erkrankung dar. Bei der chemischen Tumorthherapie (Chemotherapie) werden je nach Tumortyp meist Zytostatika unterschiedlicher Wirkungsart verwendet, so etwa Alkylantien, Nitrosoharnstoffverbindungen, Folsäureantagonisten, Pyrimidin- und Purinanaloga wie Fluorouracil, Antibiotika mit Wirkung auf die DNA-abhängige RNA-Polymerase oder Enzyme wie L-Asparaginase. Eine Gruppe von Cytostatika für die Chemotherapie sind die Mitosehemmstoffe wie etwa Taxol und Vinca-Alkaloide.

Auf Grund ihrer sehr guten Antitumor-Aktivität haben besonders die Mitosehemmstoffe in letzter Zeit verstärkte Beachtung gefunden. Die Mitosehemmer beeinflussen den Aufbau oder Abbau der aus Mikrotubuli bestehenden Teilungsspindel – und greifen somit an der Zellteilung an. Das bekannte Colchicin oder Vinca-Alkaloide binden an spezifischen Bindestellen des α - oder β -Tubulins – als Baustein der Mikrotubuli – und bewirken z.B. eine Hemmung des Aufbaus der Mikrotubuli. Andere Mitosegifte – beispielsweise das Taxol – bewirkt deren Destabilisierung.

Mitose- oder Spindelgifte sind hochgradig toxisch und sind daher für therapeutische Zwecke problematisch. Die Toxizität von Colchicin ist sogar so hoch, daß diese Substanz bislang gar nicht therapeutisch verwendet wird. Das aus Eiben (*Taxus*) isolierte Alkaloid Taxol ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

Die meisten Mitosehemmer binden an das β -Tubulin der Mikrotubuli. Dazu weisen sie Bindungsstellen auf, deren unterschiedliche hohe Spezifität für eine Klassifizierung der Mitosehemmer herangezogen wird. So werden verschiedene Gruppen wie der Colchizin-Typ, der Taxan-Typ, der Vinca Alkaloid Typ oder der Rhyoxin Typ unterschieden.

Auf Grund der hohen Toxizität der Zytostatika ist eine Therapie mit diesen Substanzen mit vielen Nebenwirkungen verbunden, die für die betroffenen Patienten oft kaum erträglich sind. Daher wird seit vielen Jahren an der Verbesserung der Therapien mit der Zielsetzung der Vermeidung oder Reduzierung der Nebenwirkungen gearbeitet. Ein Ansatz dazu stellt der Versuch dar, die Wirkstoffe gezielt nur zu den zu therapierenden Zellen – d.h. zu den Zielzellen - zu lenken.

Eine Möglichkeit zur Verwirklichung dieses Ansatzes basiert im wesentlichen darauf, zelltyp-spezifische Epitope zu identifizieren, einen Epitop-spezifischen monoklonalen Antikörper zu erzeugen und den derart gewonnen Antikörper oder Antigen-bindende Fragmente davon mit einem therapeutisch wirksamen Molekül zu koppeln. Ein derartiger Ansatz ist Gegenstand eines Forschungsprojekts der Universität von Kalifornien mit dem Ziel einer spezifischen Therapie von Brustkrebs (Sherie L. Morrison, Ph.D.: "Antibody Fusion Proteins for the Therapy of Breast Cancer", University of California, Los Angeles, 1997-1999). Hierbei wurden Antikörper gegen die brustkrebsspezifischen Moleküle her2/neu und CEA verwendet und mit immunstimulierenden Molekülen verbunden, welche die Aktivität der T-Zellen stimulieren.

Obwohl dieser Ansatz mit dem Vorteil einer hohen therapeutischen Selektivität einhergeht, ist er in der Praxis nur unter großen Anstrengungen bei hohem Aufwand und langer Entwicklungsdauer umzusetzen, da zahlreiche Entwicklungsschritte zu seiner Realisierung erforderlich sind. Hierzu müssen zunächst für den jeweiligen Zelltyp spezifische Antigene isoliert werden. Da es sich bei diesen in der Regel um Proteinantigene handelt, werden im folgenden zellspezifische Epitope des Antigens ermittelt, die möglichst geringe Ähnlichkeiten zu Epitopen der Proteine anderer Zelltypen aufweisen. Dies ist erforderlich zur Vermeidung von Kreuzreaktivitäten der therapeutisch eingesetzten Antikörper. Anschließend erfolgt die Herstellung monoklonaler, gegen das jeweilige Antigen gerichteter Antikörper, die im weiteren aufwendigen Selektions- und/oder Mutageneseverfahren wie etwa Phage Display unterzogen werden müssen, um zu einem Antikörper möglichst hoher Spezifität, bzw. möglichst geringer Kreuzreaktivität zu gelangen.

Darüber hinaus ergeben sich häufig Schwierigkeiten bei der Herstellung des gebrauchsfertigen Therapeutikums, da ein nicht-humaner Antikörper modifiziert werden muß, um ohne hohes allergenes Potential eingesetzt werden zu können. Dazu können die variablen Regionen, insbesondere jedoch die *Complementary determining regions* (CDR) in ein humanes Antikörpergerüst eingesetzt, wobei im fertigen Therapeutikum unterschiedlich große antigenspezifische Elemente des therapeutischen Antikörpers, so etwa die antigenbindenden Fragmente (Fab) zum Einsatz kommen. Dabei handelt es sich in aller Regel um antigenspezifische Elemente, die mindestens aus zwei separaten Polypeptidketten bestehen. Die Herstellung dieser komplexen antigenspezifischen Elemente und ihre Verknüpfung mit dem eigentlich therapeutischen Molekül ist in der Praxis oft aufwendig und erfordert komplexe Expressionskonstrukte und entsprechend geeignete Wirtszellen.

Bekannt sind wissenschaftliche Arbeiten, in welchen Fusionsproteinen bestehend aus Liganden und Mikrotubuli - Bindedomänen, sowie aus Liganden, Mikrotubuli - Bindedomänen und Membranpenetrationsdomänen beschrieben sind. (DE 199 25 052.9; DE 101 61 899.9; DE 101 61 738.0; DE 101 61 739.9 und DE 101 62 870.6)

Nachteile bestehen darin, dass keine Verstärkung der Wirkung durch zusätzliche Auslösung einer Immunantwort erfolgt.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, spezifische Tumorstillwachstumshemmende Fusionsproteine mit Doppelwirkung zu entwickeln. Diese Doppelwirkung besteht darin, Tumorstillwachstum durch Zytoskelett - Bindung zu hemmen, sowie Tumor durch zusätzliche Immunreaktion zu zerstören.

Die Aufgabe der Erfindung wird durch Fusionsproteine enthaltend spezifische Antigenbinde -, Mikrotubulinbinde - und Immunantwort - auslösenden Regionen gelöst.

Die Wirkung dieser Fusionsproteine besteht in der Tumorzellspezifischen Internalisierung und Hemmung der Zellteilung durch Bindung der Mikrotubuli sowie in der Auslösung tumorzell spezifischer Immunantwort. Die Mikrotubulinbinderegion kann z.B. aus Gephyrin, Tau, MID - 1 oder MAP 1 aus gewählt werden und die Immunantwort auslösende Region ist z. B. Fc - Region eines IgG - Antikörpers, B 7.1 oder B7.2 Regionen zur Auslösung einer T - Zell - Reaktion.

Die Antigenbinderegionen können vorzugsweise aus folgenden Proteinen - EGF, FGF, CSF, MGF, IL - 15 etc. ausgewählt werden.

Diese Fusionsproteine können entweder eine Protein transduktions (PTD) oder keine PTD enthalten. PTD ist dann nicht nötig, wenn die Antigen binderegion ein Ligand darstellt

welcher nach der Interaktion mit dem entsprechenden Rezeptor internalisiert wird. In anderen Fällen dient PTD dazu Fusionskonstrukt in die Zielzellen zu bringen, bzw. zu internalisieren.

Die beschriebene Proteintransduktionsdomäne (PTD) ist eine elf - Aminosäure lange Region, die eine Region des HIV Tat Proteins darstellt.

Dem Forscher Dowdy und seinen Kollegen ist gelungen, 60 Proteine in der Größen Ordnung zwischen 15 kDa und 120 kDa zu fusionieren und nach folgender Denaturierung der Fusion mit Harnstoff ins Zytosol zu transportieren. (Science (285, 1569 - 1572, 1999) und Nature biotechnology Vol. 17 S. 942, Oct. 1999).

Nach der Internalisierung des Fusionsproteins wirkt die Mikrotubuli - Bindedomäne wie z.B. Gephyrin, -Tau, MAP oder MID - 1 im Zytosol. Sie bindet Mikrotubuli und fesselt somit das Zytoskelett. Das dynamische Gleichgewicht (Wilde et al Nature cell biology 2001, March, vol. 3 und Carazo. Salas et al. Nature Cell biology 2001, March, vol.3.) der Mikrotubuli wird beeinträchtigt und die jeweilige Zelle kann sich nicht mehr teilen. Sobald sie sich nicht mehr teilt, stirbt sie.

Dadurch wird das Wachstum des Tumors, z.B. eines soliden Tumors gehemmt.

Die Fusionsproteine können zusätzlich GFP oder eine andere fluoreszente Region enthalten um die Wirkung optisch zu verfolgen und die Konzentration in einer Lösung durch Intensität der Fluoreszenz zu messen. Ausserdem können diese Fusionsproteine Gelenkregionen, vorzugsweise Fünf - Glyzin - Region, und mindestens GST - His tag oder eine andere Region zur Durchführung der Affinitätsreinigung enthalten.

In der Fig. 1 ist der Fusionskonstrukt enthaltend die N - terminale Protein transduktionsdomäne PTD, ein Ligand L, eine Mikrotubuli - Binderegion MBD, sowie die C - terminale Immunantwort - auslösende Region (engl. immune response inducing domäne IRID) schematisch dargestellt.

Das Fusionskonstrukt in der Fig. 2 enthält die ähnlichen Regionen wie der in der Fig. 1, außer der PTD, die in den Fällen der Rezeptor - vermittelten Endozytose nicht notwendig ist.

Beispiel 1

Klonierung und Expression des Fusionskonstruktes

N - IL - 15 - L - Gephyrin - Fc - C

c DNA für Gephyrin wird durch PCR kloniert, bzw. die Homosapiens Gephyrin (GPH) mRNA wird durch RT - PCR kloniert. Die Daten der GPH mRNA - Sequenz sind beim National Center für Biotechnology Information, NIH, Bethesda MD, 20 894, USA erhältlich, sowie auf der Internet - Seite von NCBI ([http:// www. ncbi. Nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) zu finden.

Die IL - 15 mRNA sowie die Fc vom IgG - mRNA werden ebenfalls durch RT - PCR kloniert.

Das Fusionsprotein bzw. das Fusionsprodukt wird aus PCR - Produkten zusammen gesetzt. Die PCR - Primern sind so konstruiert, dass sie Restriktionsstellen auf 5' und 3' Enden enthalten, um spätere Ligationsschritte durchzuführen. Die 5' und 3' Endes des IL - 15 PCR

Produkts enthalten Bam HI und Hind III Restriktionsstellen. Die 5' und 3' Enden des Gephyrin - PCR - Produktes enthalten EcoR I und KpnI Restriktionsstellen und die 5' und 3' Endes des Fc - PCR - Produktes enthalten Pst I und Sac I Restriktionsstellen.

Ligation der IL - 15, Gephyrin und Fc - sequenzen in den pUC 19 (2686 bp) - Vektor erfolgt unter Standard - bedingungen. Der PUC 19 - Vektor wird zuerst mit Bam HI und Hind 3 behandelt.

Der IL - 15 Segment wird durch diese Behandlung in den Vektor hineinligiert, pUC 19 - IL - 15 wird mit Eco RI und Kpn I behandelt, um den Gephyrin - Segment hineinzuligieren. Der pUC 19 - IL - 15 - Gephyrin - Vektor wird abschliessend mit Pst I und Sac I behandelt, um Fc Segment in den Vektor hinein zu ligieren.

Ligationspuffer wird aus 66 mM Tris, pH 7,6, 5 mM DTT und 1 mM ATP sowie aus 20 Mikroliter T4 - DNA Ligase zusammengesetzt.

Das Ligations produkt wird in E. Coli transformiert, exprimiert und abschliessend gereinigt.

9

Fusionsproteine enthaltend spezifische Antigenbinde, - Mikrotubulibinde und Immunantwort - auslösende Regionen

Patentansprüche

Beansprucht werden:

1. Fusionsproteine, dadurch gekennzeichnet dass sie spezifische Antigenbinde - Mikrotubulibinde - und Immunantwort auslösende Regionen, enthalten.
2. Fusionsproteine nach dem Anspruch 1, gekennzeichnet durch Membran - penetrations - regionen.
3. Fusionsproteine, nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikrotubulibinderegionen vorzugsweise aus folgenden Proteinen Gephyrin, Tau, MAP, MID - 1 ausgewählt werden können.
4. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie Membranpenetrationsregionen vorzugsweise aus folgenden Proteinen : gen - 3 - Protein aus Bakteriophagen fd, gp 41 oder Tat des HIV - 1 ausgewählt werden können.
5. Fusionsproteinen nach den Ansprüchen 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Immunantwortauslösenden regionen vorzugsweise aus folgenden Regionen: Fc des IgG, B7.1, B7.2 ausgewählt werden können.
6. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Antigenbinderegionen vorzugsweise aus folgenden Proteinen: EGF, FGF, CSF, MGF, IL - 15, oder anderen Liganden oder Binderegionen ausgewählt werden.
7. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1 - 6, gekennzeichnet durch GFP oder ein anderes fluoreszentes Protein.
8. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1 - 7, gekennzeichnet durch mindestens eine Gelenkregion, vorzugsweise Fünf - Glycin Region.
9. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1 - 8, gekennzeichnet durch mindestens eine GST - His tag oder eine andere Region zur Durchführung der Affinitätsreinigung.
10. Nukleinsäuresequenzen, DNA - Vektoren, Klonierungs - und Expressionssysteme für die Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1 - 9.

FIG. 1

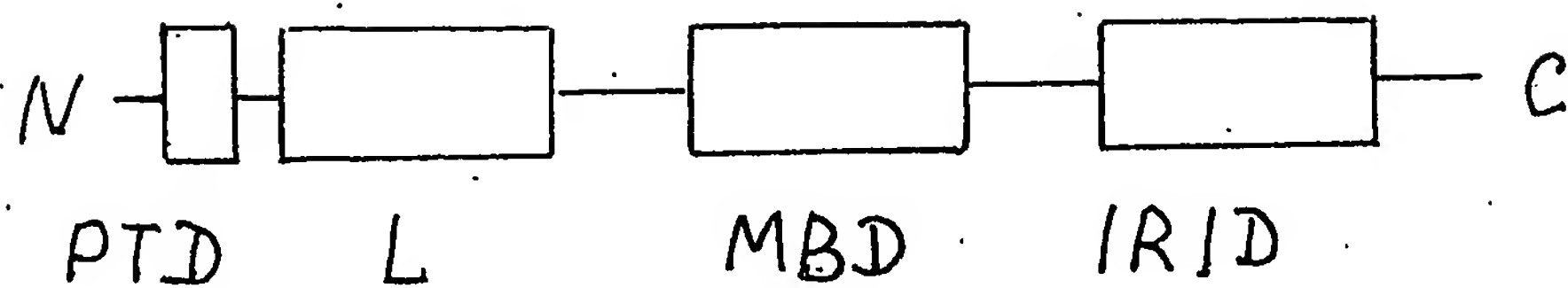
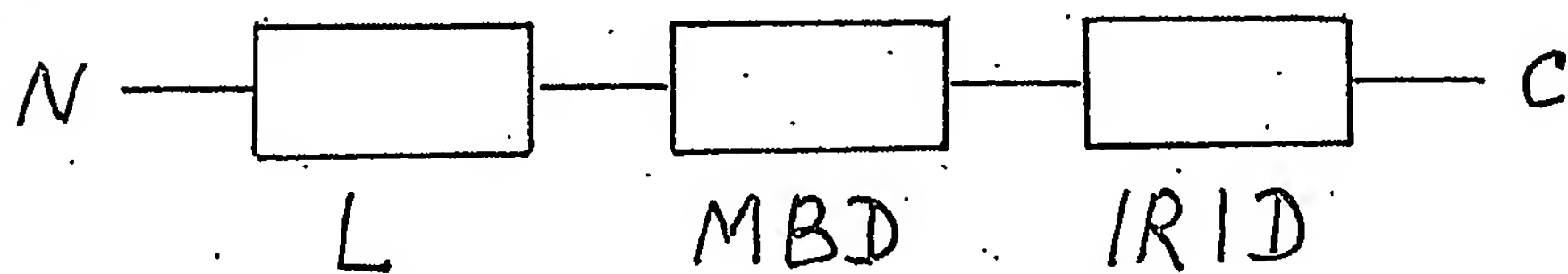


FIG. 2



Fusionsproteine enthaltend spezifische Antigenbinde, - Mikrotubulibinde und Immunantwort - auslösende Regionen

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Bereiche der Tumorphysiologie und der Biotechnologie.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, spezifische Tumorstillwachstumshemmende Fusionsproteine mit Doppelwirkung zu entwickeln. Diese Doppelwirkung besteht darin, Tumorstillwachstum durch Zytoskelett- Bindung zu hemmen, sowie Tumor durch zusätzliche Immunreaktion zu zerstören.

Die Aufgabe der Erfindung wird Fusionsproteine enthaltend spezifische Antigenbinde -, Mikrotubulibinde - und Immunantwort - auslösenden Regionen gelöst.